

云芝菌株的选育、发酵和多糖提取研究进展

李小康, 代京莎, 李诚斌, 陈 茹, 邱晓颖*

广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室; 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070

摘 要: 云芝是一种中国传统的药用真菌, 其主要活性成分为云芝多糖, 已被广泛应用于食品和医药领域, 其生物学功能越来越被关注。但是, 目前在云芝的优良菌种选育及多糖产率上还存在问题, 制约了云芝产业的发展。综述了云芝菌种选育、发酵工艺技术和多糖提取技术的研究进展, 以期云芝多糖的高产优化策略相关研究提供参考。

关键词: 云芝; 云芝多糖; 选育; 发酵; 提取

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2017.01.04

Progress on Selecting, Breeding and Fermentation of *Trametes versicolor* Strains and Polysaccharide Extraction Technology

LI Xiaokang, DAI Jingsha, LI Chengbin, CHEN Ru, QIU Xiaoying*

State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China; Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

Abstract: *Trametes versicolor* is a Chinese traditional medicinal fungus. Polysaccharide krestin, the main active component of *T. versicolor*, has been widely used in the field of food and medicine. Therefore, its biological functions have been paid more and more attention. However, there are some problems in selection and breeding of superior *T. versicolor* strains and polysaccharide yield, which restricts the development of *T. versicolor* industry. In this paper, the selecting and breeding of *T. versicolor* strains, fermentation and polysaccharide extraction technology were summarized, which was expected to provide a reference for the optimization strategy research of high-yield *T. versicolor* polysaccharide in the future.

Key words: *Trametes versicolor*; polysaccharide krestin; selecting and breeding; fermentation; extraction

云芝(*Trametes versicolor*)又名彩文云芝、多色云芝、云芝蘑、千层蘑等,在分类学上隶属于真菌门,担子菌纲(Basidiomycetes),多孔菌目(Polyporales),多孔菌科(Polyproraceae),云芝属(*Coriolus versicolor*)。云芝早在东汉前的《神农本草经》、唐代的《新修本草》、北宋的《证类本草》和明代《本草纲目》等书中就有记载^[1]。《中华人民共和国药典》(2005 版)收录的云芝,载明的药用功能为味甘、平,归心、脾、肝、肾经;具免疫调节剂功能;主要用于肝类疾病^[2]。随着人们对健康日益重视,对食品安全要求越来越高,以天然原料为主

的食品、保健品和药品,尤其是以食药菌为原料的深加工产品,需求量快速增长。云芝作为一种重要的药用真菌,其生物学特性、化学成分、活性成分及药理活性等已被广泛深入研究。大量的研究和应用表明,其主要活性成分云芝多糖和云芝糖肽,不仅具有免疫调节和保肝利胆作用,还具有抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、降血脂、益气解毒和镇痛等作用。云芝多糖作为重要活性组分原料,被广泛应用于食品、药品和保健品等,如云芝肝泰冲剂、云芝胞内糖肽胶囊、云芝多糖滴丸、云芝多糖颗粒冲剂,以及各种云芝多糖健康功能型饮料、云芝保肝护肝配方食品等,市场需求量与日俱增,其产业发展前景非常广阔。

收稿日期:2016-08-08; 接受日期:2016-10-31

基金项目:国家自然科学基金项目(31272087); 广东省科技计划项目(2009B020201012;2005B33701016)资助。

作者简介:李小康,实验师,主要从事食药菌的应用研究。E-mail:lixk@gdim.cn。* 通信作者:邱晓颖,教授级高级工程师,主要从事霉菌微生物生理特性及保健食品开发研究。E-mail:xyqiu29@163.com

但是,目前云芝多糖远无法满足市场需求,一个重要原因是其制备得率较低,存在成本高、效益低、生产工艺复杂的问题。云芝优良菌株缺乏是制约云芝多糖生产和云芝产业发展的瓶颈。另外,生长环境和栽培(发酵)方法也是影响云芝产量和品质的重要因素。云芝高产菌种选育与提高多糖产率是目前急需解决的关键问题。本文就云芝多糖的生产现状及高产优化策略作一综述,以期云芝多糖高产优化策略的研究提供参考。

1 云芝多糖的生产现状

获得云芝多糖的途径主要有两种,一种是通过收购药农采集的野生云芝子实体或以人工栽培获取的云芝子实体提取多糖;另一种是通过云芝液体发酵,从其发酵产物中(包括云芝菌丝体和发酵液)提取多糖。

由于受自然环境的影响,野生云芝子实体的产量很不稳定,受地域环境的影响品质差异较大。另外,受专业知识的限制或其他因素影响,有的药农采集的云芝子实体中难免混杂着其他种类真菌的子实体,这为后续的生产带来麻烦。采用人工栽培方法生产云芝子实体周期较长,云芝子实体产量无法满足市场需求。

因此,人们把云芝多糖发展方向转到云芝液体发酵上来。目前在市面上生产的云芝多糖大多采用液体发酵法。与子实体生产云芝多糖相比,液体发酵生产云芝多糖具有时间短、规模大、产量高、能耗低、成本低和质量可控等优点。液体发酵生产云芝多糖,已得到国内生产企业的广泛应用。通过控制和优化发酵条件、改进多糖提取技术,可以提高云芝多糖的产率,保证产品质量。但云芝液体发酵仍面临着云芝高产菌种缺乏、发酵工艺不成熟、检测技术落后以及行业标准缺乏等方面的技术问题。

2 云芝多糖的高产优化思路

随着市场对云芝多糖需求的快速增长,迫切需要解决云芝多糖产率的问题。与云芝多糖生产相关的要素有:云芝菌种、云芝生长的生态环境、发酵生产工艺、云芝多糖的提取工艺技术以及检测技术等。因此,云芝多糖高产优化策略主要包

括云芝高产菌种选育、提高云芝多糖得率、优化发酵工艺以及提取技术的升级等。

2.1 菌种选育

随着生物技术的不断发展,采用多手段、跨学科联合是未来真菌育种的趋势。近年来真菌菌株的优化选育技术得到了长足发展,包括野生菌种筛选、诱变育种以及基因工程育种等,为云芝高产菌株的优化选育提供了更加丰富有效的手段。

2.1.1 自然选育 云芝菌种自然选育虽然是传统的育种方法,但由于直接从野外自然环境中采集筛选,具有自然、安全和来源清楚等优点,仍是目前云芝菌种选育的最普遍和有效的手段之一。云芝菌种自然选育须做好云芝生态本底调查工作,为野外采集分离菌种提供依据。自然选育法主要有孢子分离法和组织分离法。王晓然等^[3]通过对天然云芝孢子进行分离纯化,以菌丝体得率和云芝糖肽得率等指标,筛选出1株云芝糖肽高产菌株 PT00407,其菌丝体得率比出发菌株提高了23.0%,云芝糖肽得率比出发菌株提高了18.9%;胡卫珍等^[4]通过液体培养和 HPGFC 测定,从不同产地收集到的云芝菌株中,筛选获得1株有效成分和糖肽产量均较高的发酵生产菌株 LS;季宏更等^[5]从国内收集到的8株云芝菌种中,以生物转化率为指标,筛选得到1株高产菌株 SYZ1;余晓斌等^[6]通过液体发酵和高压液相色谱(HPLC)检测,以国家药品标准 WS-XG-021-2002的总糖、还原糖、肽含量以及相对分子质量等指标,从各地收集到的云芝菌株中,筛选出1株最佳菌株 CV-S,其提取物符合国家药品标准 WS-XG-021-2002 要求。

2.1.2 诱变育种 云芝诱变育种能够在较短的时间内改变其基因结构,使其产生新的遗传特征,表现出优良的生物学特性,通过筛选获得能够满足需要的理想菌株。例如,张泰^[7]采用紫外诱变对云芝原生质体进行诱变育种,得到1株遗传性质较稳定、适合液体培养的云芝诱变菌株 YUBV93,经液体发酵培养得到的菌丝体干重、粗多糖肽得率及产品中总多糖含量均高于出发菌株;蒋益等^[8]采用低能 N^+ 离子注入诱变云芝原生质体,筛选出高产抗病菌株;刘广建等^[9]采用低能 N^+ 离子注入诱变云芝菌中,选育出液体发酵多糖得率高的云芝新菌株。

2.1.3 基因工程育种 基因工程育种包括原生

质体融合育种和基因组重排育种。已有报道在草菇耐低温菌株选育^[10]、冬虫夏草与蛹虫草原生质体融合^[11]、冬虫夏草富硒高产菌株选育^[12]、灵芝与糙皮侧耳融合功能菌株选育^[13]、香菇与平菇融合育种^[14]、金针菇与凤尾菇原生质体融合育种^[15]等研究中得到应用。程艳飞^[16]利用基因组重排技术,选育得到了纤维素酶活和产量均比出发菌株斜卧青霉显著提高的新菌株。

虽然诱变育种和基因工程育种是现代真菌育种的重要手段之一,由于对控制云芝产量和品质的基因或基因组研究不多,这些技术在云芝育种方面应用甚少。对野外采集筛选的优良菌种进行基因和基因组分析,研究控制云芝高产优质的基因或基因组,可更有效地开展基因工程育种工作。自然选育是比较安全稳定的获取新菌株的方法。如果在传统的自然选育中融入现代育种技术,将会取得更好的成效。

2.2 发酵工艺优化

经过几十年的发展,真菌液体发酵技术水平不断提高,工艺日臻成熟。液体发酵法能有效提高产量和增加效益,广泛应用于工业生产。如何通过液体发酵技术提高云芝菌丝体产量以及云芝多糖的产率,已成为人们热衷研究的课题。然而不同地区、不同品系的云芝菌株,其生物学特性有所不同,液体发酵生产所需的营养与生长条件亦不尽相同,多糖产量、质量及生理活性也有差异。影响液体发酵得率和质量的因素主要有菌种、培养基、发酵条件、发酵流程、发酵规模、发酵后处理工艺和储存方式等。因此,云芝的液体发酵必须根据生产菌株的生理特性,对发酵工艺进行优化,包括培养基的优化以及培养条件的优化,使菌株在最适宜的环境和条件中生长繁殖,以获得更高产率。

2.2.1 培养基的优化 培养基配方是发酵工艺最重要的基础之一。云芝液体发酵常用的培养基配方组成主要包括碳源、氮源、无机盐、微量元素、维生素、矿物质、酸碱度调节剂等。其中,碳源、氮源、碳氮比、维生素和矿物质等是调节云芝生长及多糖产量的重要因素。不同的菌株对培养基的要求不同,培养基的养分调配也不尽相同。根据云芝菌种的特性,在培养基中加入特殊的生长因子,既有利于云芝的生长又可抑制杂菌的生长。

马海燕等^[17]通过正交实验得出云芝液体发酵最适培养基为:葡萄糖 20 g/L、蔗糖 5 g/L、酵母粉 2 g/L、蛋白胨 20 g/L、 KH_2PO_4 2.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L 和 VB_1 8 mg/L,菌丝体产量高达 22.9 g/L,产量提高了 1.7 倍。曾化伟等^[18]用 29 组培养基配方进行最优培养基配方筛选,结果表明,云芝菌液体发酵最优培养基为:黄豆粉 20 g/L、葡萄糖 30 g/L、玉米粉 10 g/L、酵母膏 5 g/L、 CaCO_3 1.5 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、 MgSO_4 1.5 g/L,获得菌丝干重为 21.00 g/L。李渊等^[19]在对云芝菌丝体液体发酵的较优条件进行研究,认为葡萄糖、马铃薯粉是适宜碳源,蛋白胨、花生粉、黄豆粉是适宜氮源。况明燕等^[20]采用正交试验研究云芝液体发酵菌丝体生长最适碳源和氮源,得出最适碳源和最适氮源分别为乳糖和酵母浸膏。

2.2.2 培养条件的优化 与发酵条件控制有关的措施和参数主要包括整个发酵系统的洁净状况(发酵系统的清洗灭菌)、接种量、温度、搅拌速度、通气量、溶解氧、pH、菌丝形状、发酵液中菌丝体重量、无菌检测和监控、发酵过程各参数的监控和检测方案等。对培养条件进行优化需要做大量的试验,须逐级放大、逐级调试,包括从摇床培养、扩大培养、中试和生产验证等。

于清伟等^[21]对云芝 500 mL 摇瓶液体培养条件进行了研究,发现云芝发酵最适条件为:温度 25~30℃、装液量 150 mL、转速 120~150 r/min;胡晶等^[22]对云芝液体摇瓶发酵条件进行了优化,认为云芝胞外多糖发酵培养的最适条件为:蔗糖:蛋白胨为 20、pH 为 5.0,优化后云芝发酵生物量提高了 42.49%、胞外多糖提高了 20.58%;林晓霞^[23]在优化培养基基础上,进行 70 L 发酵罐扩大实验和 10 t 工业生产规模试验,发酵周期 32 h,最终生物量达到 13.0 g/L,云芝糖肽产率平均为 2.21 g/L。

随着发酵技术的进步,发酵过程的自动化程度越来越高,实施全程智能化管理和监控,云芝液体发酵工艺和技术将得到快速提升。

2.3 人工栽培子实体

野生云芝子实体自然资源十分匮乏,人工栽培子实体是获得云芝多糖的一个重要途径。

2.3.1 人工栽培子实体的培养基 在自然界中,

云芝多生长于腐木中,使用椴木或木屑作为人工栽培云芝子实体的培养基,最接近自然生长。但是,椴木或木屑栽培子实体需要消耗大量的木材,不利于环保,且生产成本不断攀升。因此,人们在生产食用菌子实体时多使用代料栽培方法。可作为生产食用菌子实体代料培养基的材料主要有甘蔗渣、棉籽壳、稻(麦)杆、废纸等。

2.3.2 人工栽培子实体的方法 代料栽培方法是人工栽培云芝子实体的重要手段。选择云芝栽培的代料,需进行碳源含量、氮源含量、碳氮比以及云芝生长需要的其他营养成分的分析,以便适当补充添加有利于云芝菌丝体生长和形成子实体的养分。

云芝人工栽培子实体,应当注重智能化和集约化。广东省微生物研究所将热泵、热回收和水帘原理运用于食药菌工厂化生产中,研制出的节能温度调控系统和技术,用于食药菌的人工气候适时调控,调节精度优于常规的工厂化栽培调节系统,该技术已大规模推广到近百家食药菌生产企业中应用,同时建立起具有高新技术、促进产业发展的食药菌标准体系,显著提升了食药菌行业的现代化生产技术水平。建立了符合国情和绿色节能要求的食药菌工厂化生产模式以及“公司+农户”模式进行规模化生产。通过建设大型基地,提供新优菌种、工厂化栽培加工新技术、新装备和产业化示范,大力推动了食用菌产业技术全面升级。

2.4 提取工艺的优化

提取工艺技术的提升能够提高产率、保证质量、降低成本。常用的传统提取方法主要有:水提醇沉法、酸(碱)提取法、生物酶提取法和超声波提取法。一些提取新技术也正在应用于云芝多糖的提取,如:超滤法、CO₂超临界流体法、双水相萃取法、高压脉冲法。此外还有动态超高压微射流辅助提取法、澄清剂辅助提取法、冻融技术辅助提取法等^[24]。

近年来,不断有提取工艺技术创新的报道。雷迎等^[25]采用超声波提取法来优化云芝多糖的提取工艺,多糖提取率可高达 13.87%。汪洁等^[26]对酶法、超声波法提取云芝子实体多糖进行了比较,结果表明,采取酶超声波联用提取云芝多糖的得率最高,选用先酶解后超声波提取的方法,多糖得率比酶解法提高了 30.79%,比超声波提取

法提高了 16.08%。丁亚波等^[27]在热水浸提醇沉法的基础上,结合纳滤膜的使用,进一步对醇沉工艺进行了优化,使云芝糖肽成品的质量和得率大幅提高。纪乐军等^[28]采用微滤超滤新工艺提取云芝胞内糖肽,提取得率高,总糖含量高,单糖含量低,菌体残渣的总糖和单糖低,膜通量高易清洗恢复。微滤超滤膜分离提取云芝胞内糖肽,避免了传统醇沉工艺使用大量的乙醇有机溶剂,提高了厂房和设备的安全系数,具有工艺设备简单、操作简便、质量稳定、安全环保、成本相对较低等优点,是生产云芝胞内糖肽的有效方法。

3 展望

随着生活水平的提高,人们更加注重健康。市场对云芝的需求量不断攀升,而云芝自然资源却在逐渐减少。近年来在云芝资源的发掘、菌种选育、人工子实体栽培、人工液体发酵、云芝多糖分离与纯化、组成结构鉴定及云芝有效成分的发掘等方面进行了大量研究;各种新技术、新方法在云芝的研发和产业发展中得到更多的应用,取得了可喜的成就。

未来药用真菌研发将更加注重跨领域、多学科联合,多技术、多途径渗透,以及智能化、大数据应用。建立药用真菌生态数据库和基因指纹图谱,构建种质资源库,为今后云芝的研究和产业发展提供了科学依据和手段。积极开展云芝近亲种类的研究和开发,寻找云芝替代品种,以解决云芝资源严重不足的问题;将基因工程育种技术应用于云芝育种中,探索采用新型基因编辑技术进行云芝基因组重排实现对云芝产量、多糖含量的调控,获得理想菌株;创新菌种鉴定和功能评价方法并应用于育种工作中;构建食药菌功能因子筛选平台,进一步发掘云芝新的药用功能等。可以预见,未来云芝多糖必将在食品、医药和保健等领域得到更广泛的应用,云芝产业将得到更好的发展。

参 考 文 献

- [1] 赵新湖.云芝的本草考证及其药理活性成分的研究[D].长春:吉林大学,硕士学位论文,2015.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [3] 王晓然.云芝糖肽高产菌株的选育及其发酵工艺研究[D].

- 上海;上海师范大学,硕士学位论文,2013.
- [4] 胡卫珍,沈伟桥,余晓斌.云芝糖肽的液体发酵研究[J].食品科技,2007(5):139-142,154.
 - [5] 季宏更,郑惠华,汪洁,等.云芝高产栽培技术试验初报[J].食用菌,2014(4):42-43.
 - [6] 余晓斌,胡卫珍,濮文林.液体发酵法生产云芝胞内糖肽[J].食品与生物技术学报,2006,25(1):65-69.
 - [7] 张泰.云芝 Cov_1 菌株的诱变育种-提取工艺及发酵条件的探究[D].上海:上海师范大学,硕士学位论文,2010.
 - [8] 蒋益,郑惠华,刘广建,等.低能 N^+ 离子注入诱变选育云芝高产抗病菌株的研究[J].食用菌,2014(2):18-20.
 - [9] 刘广建,郑惠华,薛璟,等.诱变筛选云芝高产多糖菌株及其液体培养条件优化[J].食用菌,2016(3):21-23.
 - [10] 韩业君,曹晖,陈明杰,等.草菇原生质体制备与再生及诱变效应研究[J].食用菌学报,2004,11(2):1-6.
 - [11] 郭成金,赵润,朱文碧.冬虫夏草与蛹虫草原生质体融合初探[J].食品科学,2010,31(1):165-171.
 - [12] 朱蕴兰,陈安徽,王陶,等.冬虫夏草原生质体诱变育种研究[J].食品科学,2010,31(5):256-260.
 - [13] 王淑珍,白晨,范俊,等.灵芝与糙皮侧耳原生质体融合子基因组 RAPD 分析[J].食用菌学报,2003,10(1):1-5.
 - [14] 刘振岳,董毓琨,泰立芳,等.平菇与香菇属间原生质体融合的研究[J].遗传学报,1991,18(4):352-357.
 - [15] 肖在勤,谭伟,彭卫红,等.金针菇与凤尾菇科间原生质体融合研究[J].食用菌学报,1998,5(1):6-12.
 - [16] 程艳飞.基因组重排在产纤维素酶斜卧青霉菌种改造中的应用[D].济南:山东大学,博士学位论文,2009.
 - [17] 马海燕,郭成金.云芝菌丝体液体培养基的筛选[J].中国食用菌,2007(4):34-36.
 - [18] 曾化伟,郑惠华,梁伟,等.云芝菌液体发酵培养基的筛选[J].河北科技师范学院学报,2015,29(1):34-38.
 - [19] 李渊.云芝胞内糖肽液体发酵及提取工艺的优化[D].无锡:江南大学,硕士学位论文,2013.
 - [20] 况明燕,邓功成,廖婷婷,等.云芝菌丝体液体发酵条件优化研究[J].现代农业科技,2015(2):73-74,76.
 - [21] 于清伟,王明才,薛会丽,等.云芝菌丝体液体培养条件的研究[J].山东农业科学,2009(11):80-82.
 - [22] 胡晶,任怡琳,陆震鸣.云芝胞外多糖液体发酵条件的优化[J].食用菌,2016(1):17-18.
 - [23] 林晓霞,熊强,陆利霞,等.云芝糖肽的液体发酵培养基的研究[J].生物加工,2006,4(2):64-68.
 - [24] 金莉娜,东方,刘振锋,等.生物活性多糖提取工艺研究进展[J].滨州学院学报,2012,28(6):101-105.
 - [25] 雷迎,陈宝,王茂茂,等.云芝多糖提取工艺的优化及其性能研究[J].食品科技,2011,36(11):169-173.
 - [26] 汪洁,全卫丰,刘广建,等.云芝多糖提取工艺的研究比较[J].食用菌,2010(3):69-71.
 - [27] 丁亚波,黄建民,张华峰,等.云芝糖肽发酵液提取工艺的优化[J].北方药学,2013,10(5):44-45.
 - [28] 纪乐军,陈士翠,张丽,等.微滤-超滤提取云芝胞内糖肽工艺的研究[J].食品与发酵科技,2014,50(2):27-30.